Wolbachia 在我国广赤眼蜂种群内的感染

钟 敏，沈佐锐*

（中国农业大学昆虫学系，北京 100094）

摘要： *Wolbachia* 是广泛分布于节肢动物生殖组织内的一类细胞内共生菌，它属于原细菌的 α 亚类，能够通过调控寄主的生殖活动而促进其在寄主种群中的扩散。通过对 *wsp* 基因的克隆及 PCR-RFLP 分析确定了 *Wolbachia* 在我国广赤眼蜂种群内的存在，并发现有 2 种 *Wolbachia* 菌系的感染，命名为 *wEvaA* 和 *wEvaB*。经过克隆分离得到了这 2 种 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列，在 GenBank 的登录号为 AY390279 和 AY390280，并由基于 *wsp* 基因的聚类树中发现，这两种 *Wolbachia* 菌系均属于 A 组。

关键词： *Wolbachia*；细胞内共生菌；感染；广赤眼蜂；*wsp* 基因；RFLP

中图分类号： Q966　　**文献标识码：** A　　**文章编号：** 0454-6296(2004)06-0732-06

Infection of the endosymbiont *Wolbachia* in population of *Trichogramma evanescens* in China

ZHONG Min，SHEN Zuo-Rui* (Department of Entomology，Chinese Agriculture University，Beijing 100094，China)

Abstract： *Wolbachia*，belonging to α-Proteobacteria，is a commonly widespread group of intracellular symbiotic bacteria found in reproductive tissues of arthropods. The bacteria may spread in host populations through regulation of host reproduction. In this study，the presence of *Wolbachia* was detected in a natural population of *Trichogramma evanescens* in China based on the *wsp* gene cloning and PCR-RFLP analysis. Two *wsp* genes of *Wolbachia* infecting *T. evanescens* were amplified and sequenced，with their GenBank accession numbers as AY390279 and AY390280. Also two new *Wolbachia* strains were identified and named as *wEvaA* and *wEvaB*. Through constructing and analysing the phylogenic tree of *Wolbachia* strains in *Trichogramma* spp. based on *wsp* gene，we found these two strains belonged to A group.

Key words： *Wolbachia*；intracellular symbiotic bacteria；infection；*Trichogramma evanescens*；*wsp* gene；RFLP

Wolbachia pipientis 是一种细胞内共生细菌，普遍寄生于昆虫、甲壳动物、螨虫和丝状线虫类动物体内，主要寄生于寄主的生殖器官中，属于原细菌的 α 亚类，是一类立克次氏体。*Wolbachia* 随母系遗传，并能在昆虫的个体、群体间迅速进行横向传播(horizontal transmission)，参与调控寄主的多种生殖活动(龚鹏等，2002)，如诱导细胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility)、诱导孤雌生殖(parthenogenesis inducing)、雌性化(feminization)、雄性致死(male killing)以及增强雌性繁殖力和雄性生育力(fecundity and fertility-modifying)等等，从而引起寄主的生殖行为异常，对于种群分化及物种形成都有一定作用。到目前为止，已有证据证实 *Wolbachia* 的超感染现象在许多昆虫的自然种群中存在(Jamnongluk *et al.*，2002；Ijichi *et al.*，2002)。

广赤眼蜂 *Trichogramma evanescens* 是我国生物防治中应用的主要赤眼蜂种，通过广赤眼蜂在田间的大量放飞，可以有效地防治棉铃虫、烟青虫、菜青虫、斜纹夜蛾、甘蓝夜蛾等多种鳞翅目害虫。鉴于此，人工繁殖和释放赤眼蜂已经成为生物防治的重要实践。深入研究广赤眼蜂与其共生微生物 *Wolbachia* 的关系有望开辟广赤眼蜂种群遗传改良的新途径，进而提高生物防治的有效性。

wsp 基因是一种编码 *Wolbachia* 表面蛋白(surface protein)的基因。我们通过对 *wsp* 基因的克隆及 PCR-RFLP 分析，以明确 *Wolbachia* 在我国广赤眼蜂种群内的感染情况。

基金项目：博士点基金资助项目(20020019013)；国家自然科学基金项目(30370961，30471166)

作者简介：钟敏，女，1978 年 7 月生，山东莱州人，硕士研究生，从事昆虫分子生物学研究，E-mail：cassie-xy2003@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：ipmist@cau.edu.cn

收稿日期 Received：2003-10-30；接受日期 Accepted：2004-08-04

1 材料与方法

1.1 材料

(1)广赤眼蜂：实验所用的广赤眼蜂采自吉林农业大学(长春)实验菜田，由北京农林科学院赤眼蜂繁殖基地繁育，是源自田间的自然种群。于本实验室的26℃光照培养箱中饲养约10代。(2)培养基：LB培养基用于克隆实验。(3)酶及生化试剂：Taq DNA聚合酶购自华美生物工程公司；X-gal、T4 DNA连接酶、DNA回收纯化试剂盒等购自北京六合通公司；限制性内切酶 *Ksp*AⅠ和 *Bcl*Ⅰ购自上海生工生物工程有限公司。其他试剂均为市售分析纯。(4)实验所用引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 *wsp* 基因扩增及其电泳检测

取广赤眼蜂40～50头，参照Gong和Shen(2002)的方法提取总DNA。*wsp* 基因的PCR扩增参照Zhou等(1998)的方法。扩增引物为wsp81F：5′-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3′和wsp691R：5′-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3′。

PCR扩增体系为20 μL：含模板DNA 1.5 μL，20 μmol/L正向引物和反向引物各0.5 μL，10 mmol/L dNTP 0.5 μL，5 U/μL Taq DNA聚合酶(Promega)0.2 μL，10×缓冲液2 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μL，用去离子水加至20 μL。PCR扩增程序为：94℃，1 min；55℃，1 min；72℃，1 min；共35个循环。

扩增反应结束后，将PCR特异性扩增产物在1.5%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测(电压75 V，电泳缓冲液为1×TAE)。

1.3 PCR特异性扩增产物的回收及克隆

PCR扩增得到一条约600 bp的条带，紫外灯下切割回收，纯化后与pGEM-T载体(Promega)在4℃连接过夜。然后将连接产物与感受态细胞进行热击转化(感受态菌株为DH5α)。转化子于含60 μg/mL的氨苄抗性的LB培养基上37℃倒置培养18 h，筛选阳性克隆。

1.4 对 *wsp* 基因的RFLP分析

将筛选出的26个阳性克隆使用 *wsp* 基因正反向引物扩增，扩增产物经过乙醇沉淀法纯化后用限制性内切酶 *Ksp*AⅠ和 *Bcl*Ⅰ酶切。反应温度分别为37℃和55℃，反应体系均为20 μL，酶切过夜。琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

1.5 序列分析及类群鉴定

根据酶切图谱对26个阳性克隆进行分类，选取其中具有显著差异条带的3种类型的克隆产物(每种随机选择3个克隆产物)，由上海联合基因集团进行序列测定，最后得到2条 *wsp* 基因序列。

根据Zhou等(1998)方法选取特定组(A组和B组)的 *wsp* 基因特异性引物对得到的2条 *wsp* 基因序列进行类群鉴定。A组的正反向引物分别为wsp136F：5′-TGAAATTTTACCTCTTTTC-3′和wsp691R：5′-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3′；B组的正反向引物分别为wsp81F：5′-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3′和wsp522R：5′-ACCAGGTTTTGCTTGATA-3′。

1.6 数据分析

凝胶成像使用ChemiImager 4400凝胶成像系统。序列比对分析使用DNAMAN、Clustal X 1.8和MEGA 2.1等软件。

2 结果与分析

2.1 广赤眼蜂感染 *Wolbachia* 的电泳检测结果

利用 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的一对通用引物(81F，691R)，成功地从广赤眼蜂总DNA中扩增到一条600 bp左右的 *wsp* 基因片段(图1)，证实了 *Wolbachia* 在我国广赤眼蜂体内的感染。

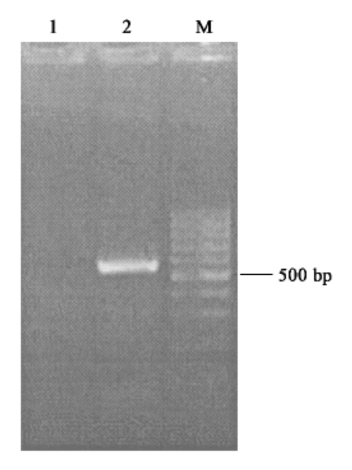


图1 广赤眼蜂体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因扩增产物

Fig. 1 The *wsp* PCR product of *Wolbachia* in *Trichogramma evanescens*

1. 阴性对照 Negative control；2. 广赤眼蜂体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因扩增产物(600 bp左右) The *wsp* gene product of *Wolbachia* in *T. evanescens*；M：100 bp的核酸分子量标准 100 bp DNA ladder.

2.2 对 *wsp* 基因进行PCR-RFLP分析的结果

对PCR扩增得到的26个阳性克隆用限制性内切酶 *Ksp*AⅠ和 *Bcl*Ⅰ分别进行酶切，选取其中效果较好的22个进行电泳得到了如图2所示的RFLP图

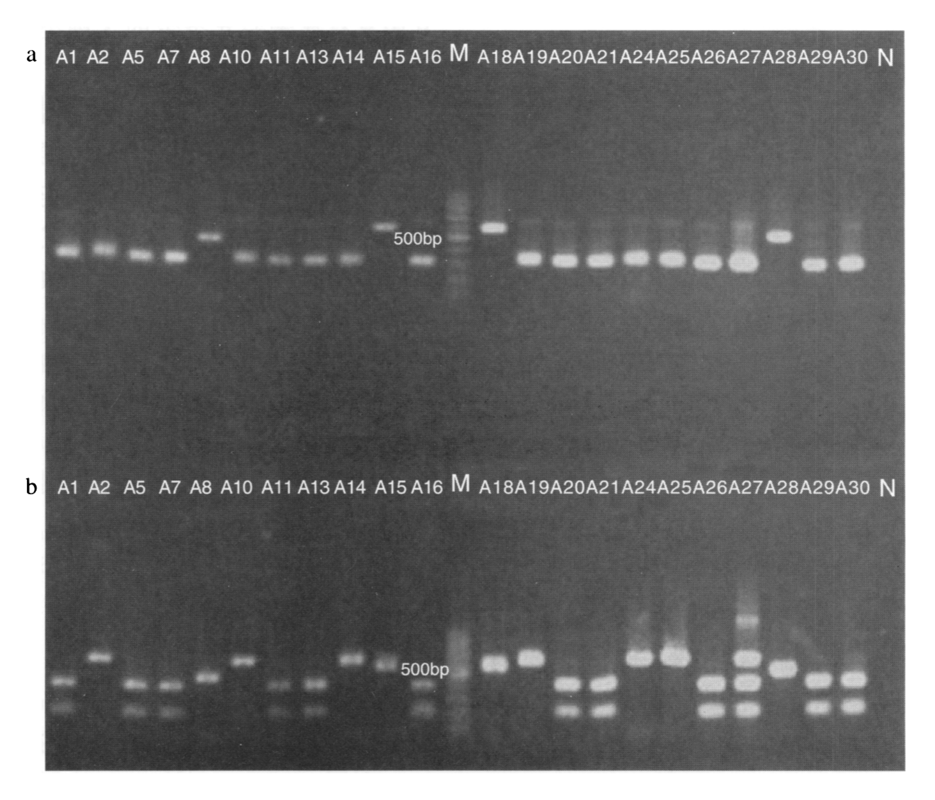


图2 限制性内切酶 *Ksp*AⅠ（a）和 *Bcl*Ⅰ（b）切割 *wsp* 基因扩增产物的酶切图谱

Fig. 2 The electrophoretic map of restriction enzymes *Ksp*AⅠ（a）and *Bcl*Ⅰ（b）digestion in PCR products by amplification of *wsp* gene from *Trichogramma evanescens*

Ⅰ型克隆Ⅰ-type clones: A2, A10, A14, A19, A24 and A25; Ⅱ型克隆Ⅱ-type clones: A1, A5, A7, A11, A13, A16, A20, A21, A26, A29 and A30; Ⅲ型克隆Ⅲ-type clones: A8, A15, A18 and A28; M: 100 bp DNA ladder; N: 阴性对照 Negative control.

谱,根据图中的酶切条带的大小异同发现有3个RFLP类型,分别以Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ表示。图中泳道A2、A10、A14、A19、A24和A25为Ⅰ型克隆,A1、A5、A7、A11、A13、A16、A20、A21、A26、A29和A30为Ⅱ型克隆,泳道A8、A15、A18和A28为Ⅲ型克隆。Ⅰ型克隆有*Ksp*AⅠ的酶切位点而没有*Bcl*Ⅰ的酶切位点,Ⅱ型克隆则能同时被*Ksp*AⅠ和*Bcl*Ⅰ切割,而Ⅲ型克隆没有*Ksp*AⅠ和*Bcl*Ⅰ的酶切位点。泳道A27出现了怪异条带,对其测序发现模板有污染,这可能是实验操作造成的误差所致。

2.3 形成超感染的2种 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列分析

对3个RFLP类型(每种类型随机选择3个克隆产物)的*wsp*基因进行序列测定,并通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)站点中提供的BLAST Sequence Similarity Searching工具,与GenBank中注册的核苷酸序列进行同源性比较,得到了2条不同的*wsp*基因序列。其中Ⅰ型克隆和Ⅱ型克隆序列与GenBank中已知的*wsp*基因相似度较高,而Ⅲ型克隆序列与*wsp*基因同源性极低(只有20%左右),因而可以确定,Ⅲ型克隆得到的不是目的基因序列。我们将得到的这2条*wsp*基因序列分别在GenBank上注册,并以其相应的*Wolbachia*菌系(寄主的种名)分别命名为*wEvaA*(登录号为AY390279)和*wEvaB*(登录号为AY390280)。*wEvaA*共588 bp,其中180 A,99 C,126 G和183 T,含量分别为30.61%,16.84%,21.43%和31.12%, A+T = 61.73%,C+G = 38.27%;限制性内切酶位点分析显示,在272 bp处有*Ksp*AⅠ酶切位点。*wEvaB*共540 bp,其中166 A, 84 C, 124 G和166 T,含量分别为30.74%,15.56%,22.96%和30.74%,A+T = 61.48%,C+G = 38.52%;在246 bp处有*Ksp*AⅠ酶切位点,而在352 bp处有*Bcl*Ⅰ的酶切位点。

2.4 聚类树的建立

将所得的序列在DNAMAN软件中整理,利用Clustal X分析软件排序,然后输入MEGA 2.1,采用距离法(Distance)在Kimura-2 Parameter模型下,建立NJ树(图3),各个分支的bootstrap置信度用1 000次自导复制来评价。从系统树的拓扑结构可以看出,依据*wsp*基因将*Wolbachia*分成A、B两个组,*wEvaA*

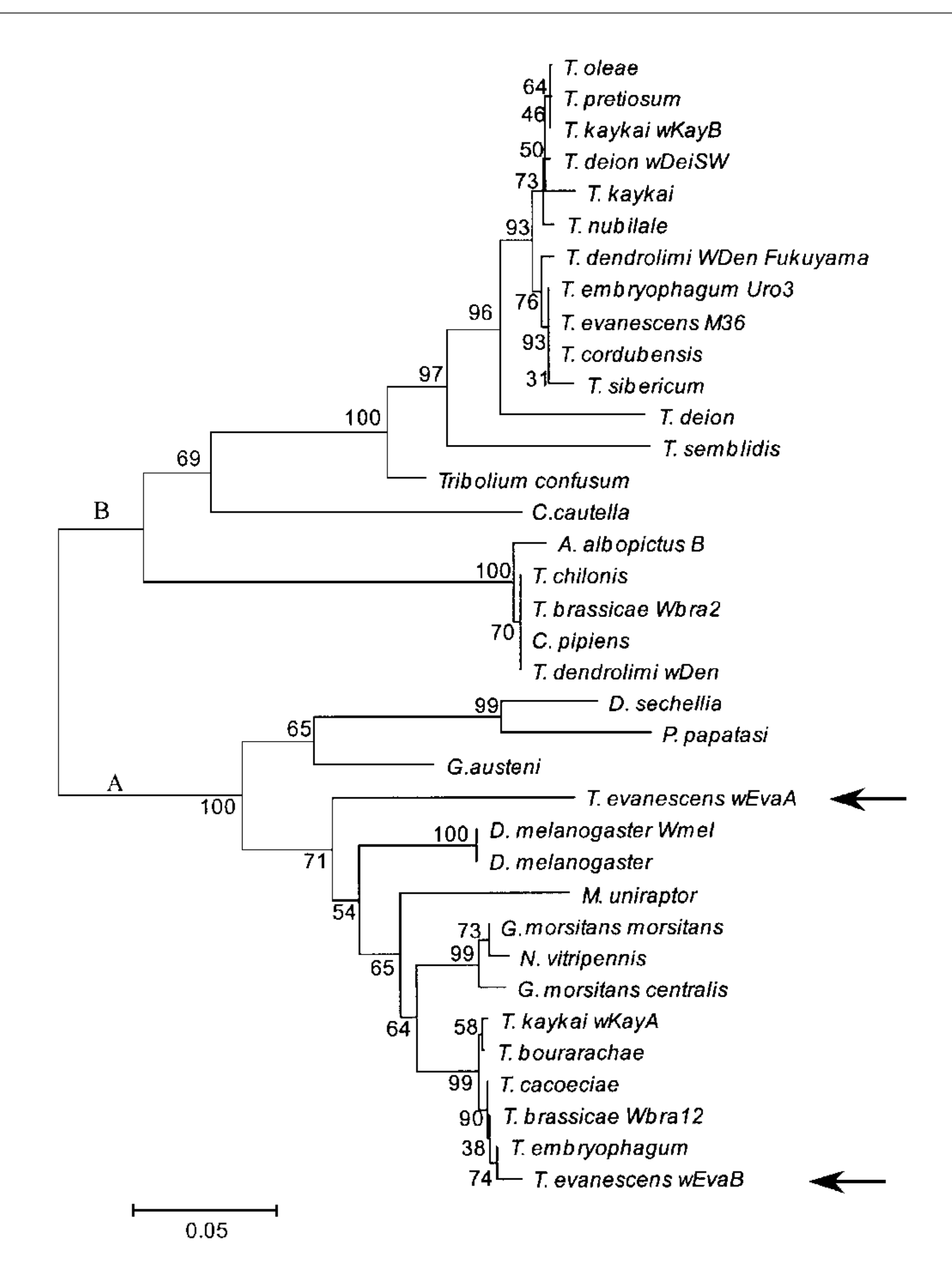


图 3　基于 *wsp* 基因序列的赤眼蜂体内共生菌 *Wolbachia* 的系统进化关系示意图

Fig. 3　Phylogenic tree of *Wolbachia* strains in *Trichogramma* spp. based on *wsp* gene

箭头所指的 2 种即为感染广赤眼蜂的 *Wolbachia*，与其构建聚类树的其他赤眼蜂共生菌 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列信息均从 GenBank 上得到(表 1)。The two new strains infecting *T. evanescens* are denoted by the arrows. The other *wsp* genes refer to GenBank (see Table 1).

和 *wEvaB* 均属于 A 组(图 3 中箭头所示)。

3　讨论

3.1　基于 *wsp* 基因的聚类树

本实验所用的检测方法是基于 *wsp* 基因的分子检测技术。根据 GenBank 数据库中各类群 *wsp* 基因的注册情况，抽取各类群的代表性物种建立了广赤眼蜂体内 2 种 *Wolbachia* 基于 *wsp* 基因的系统分类体系。用 *wsp* 基因的分组引物分别对 2 种 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因(*wEvaA* 和 *wEvaB*)进行 PCR 扩增，结果表明 *wEvaA* 和 *wEvaB* 菌系均属于 A 组，这与系统树分析结果一致。根据 Zhou 等(1998)提供的分类标准，2 个序列存在 2.5% 以上的差异则应分

表1 用于构建系统树的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列信息

Table 1 The information of *wsp* gene, for the phylogenic tree of *Wolbachia* strains based

品系 *Wolbachia* strain	寄主 Host species	GenBank No.	来源国家 Country source
A 组 *Wolbachia* group A			
WalbA	*Aedes albopictus*	AF020058	美国 USA
Waus	*Glossina austeni*	AF020077	美国 USA
Wcen	*Glossina morsitans centralis*	AF020078	美国 USA
Wmors	*Glossina morsitans morsitans*	AF020079	美国 USA
Wmel	*Drosophila melanogaster*	AF020063	美国 USA
Wuni	*Muscidifurax uniraptor*	AF020071	美国 USA
Wmel	*Drosophila melanogaster* (strain *YW67c23*)	AF020072	美国 USA
Wha	*Drosophila sechellia*	AF020073	美国 USA
WvitA	*Nasonia vitripennis*	AF020081	美国 USA
Wpap	*Phlebotomus papatasi*	AF020082	美国 USA
wBou	*Trichogramma bourarachae*	AF071913	荷兰 Netherlands
Wcac1	*T. cacoeciae*	AF452644	德国 Germany
Wemb	*T. embryophagum*	AY288524	中国 China
Wbra12	*T. brassicae*	AF452645	中国 China
wKayA	*T. kaykai*	AF071912	荷兰 Netherlands
wEvaA	*T. evanescens*	AY390279	中国 China
wEvaB	*T. evanescens*	AY390280	中国 China
B 组 *Wolbachia* group B			
WalbB	*Aedes albopictus*	AF020059	美国 USA
Wpip	*Culex pipiens*	AF020061	美国 USA
WcauB	*Cadra cautella*	AF020076	美国 USA
Wcon	*Tribolium confusum*	AF020083	美国 USA
Semv	*Trichogramma semblidis*	AF245162	法国 France
wChi	*T. chilonis*	AY311486	中国 China
Grey	*T. cordubensis*	AF245164	葡萄牙 Portugal
Wdei	*T. deion*	AF020084	美国 USA
WKayLC	*T. kaykai*	AF071927	荷兰 Netherlands
wNub	*T. nubilale*	AF071926	荷兰 Netherlands
S2	*T. oleae*	AF245166	前南斯拉夫 Yugoslavia
T191	*T. pretiosum*	AF245163	乌拉圭 Uruguay
wSib	*T. sibericum*	AF071923	荷兰 Netherlands
Uro3	*T. embryophagum*	AF245165	爱尔兰 Iran
wDeiSW	*T. deion*	AF071925	荷兰 Netherlands
M36	*T. evanescens*	AF245167	法国 France
wKayB	*T. kaykai*	AF071924	荷兰 Netherlands
Wbra2	*T. brassicae*	AY177733	中国 China
WDen Fukuyama	*T. dendrolimi*	AB094397	日本 Japan
WDen	*T. dendrolimi*	AF394235	中国 China

于2个亚组中，在A组中，根据已经建立的亚组分类体系可以看出，*wEvaB* 菌系属于 Kue 亚组，而 *wEvaA* 菌系则代表了一个新的亚组。

3.2 *Wolbachia* 在广赤眼蜂种群中超感染的可能性

超感染(superinfection)又称多重感染，是指在一种寄主的个体体内有2种或更多种共生菌存在的现象(Werren, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999; Wade, 2001; Kondo *et al.*, 2002)。我们在广赤眼蜂种群内发现了 *Wolbachia* 2个菌系的存在，这有助于进一步了解广赤眼蜂体内是否存在 *Wolbachia* 的超感染现象。目前发现的这2个菌系可能分别存在于广赤眼蜂种群中的不同个体体内，也不能排除一个广赤眼蜂个体同时被这2个菌系感染的情况。这仍需要进一步实验的验证。

致谢 感谢北京市农林科学院赤眼蜂繁殖基地和河北省农业科学研究院旱作研究所提供广赤眼蜂蜂种，感谢中国农业大学分子植病室的周善跃博士在实验原理及方法方面给予的指导和帮助。

参考文献(References)

Cook JM, Butcher RDJ, 1999. The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. *Res. Popul. Ecol.*, 41: 15–28.

Gong P, Shen ZR, 2002. Molecular diagnostic techniques of *Wolbachia*. *Hereditas*, 24(2): 207–210. [龚鹏，沈佐锐，2002. PCR 为基础的分子技术检测沃尔巴克氏体的研究进展. 遗传，24(2): 207–210]

Gong P, Shen ZR, 2002. Molecular identification of a *Wolbachia* endosymbiont in *Trichogramma dendrolimi*. *Progress in Natural Science*, 12(5): 388–391.

Gong P, Shen ZR, Li ZH, 2002. *Wolbachia* endosymbionts and their manipulation of reproduction of arthropod hosts. *Acta Entomologica Sinica*, 45(2): 241–252. [龚鹏，沈佐锐，李志红，2002. *Wolbachia* 属共生细菌及其对节肢动物生殖活动的调控作用.

昆虫学报,45(2): 241 – 252]

Ijichi N, Kondo N, 2002. Internal spatiotemporal population dynamics of infection with three *Wolbachia* strains in the adzuki bean beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 4 074 – 4 080.

Jamnongluk W, Kittayapong P, Baimai V, O'Neill SL, 2002. *Wolbachia* infections of tephritid fruit flies: molecular evidence for five distinct strains in a single host species. *Current Microbiology*, 45: 255 – 260.

Kondo N, Ijichi N, Shimada M, Fukatsu T, 2002. Prevailing triple infection with *Wolbachia* in *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Molecular Ecology*, 11: 167 – 180.

Meer MMM, Witteveldt J, Stouthamer R, 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Molecular Biology*, 8(3): 399 – 408.

Mitsuhashi W, Saiki T, Wei W, Kawakita H, Sato M, 2002. Two novel strains of *Wolbachia* coexisting in both species of mulberry leafhoppers. *Insect Molecular Biology*, 11(6): 557 – 584.

Schilthuizen M, Stouthamer R, 1997. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 264: 361 – 366.

Schilthuizen M, Stouthamer R, 1998. Distribution of *Wolbachia* among the guild associated with the parthenogenetic gall wasp *Diplolepis rosae*. *Heredity*, 81: 270 – 274.

Stouthamer R, Breeumer JAJ, Hurst GDD, 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53: 71 – 102.

Wade MJ, 2001. Infectious speciation. *Nature*, 409: 675 – 677.

Werren JH, 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 587 – 609.

Zhou WG, Rousset F, O'Neill SL, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 309 – 315.

（责任编辑：黄玲巧）